J-TEC

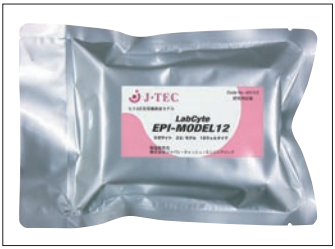
取 扱 説 明 書

研究用試薬

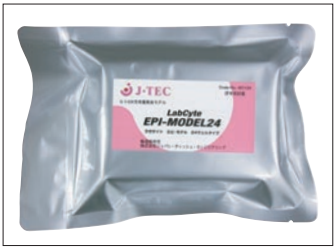
ヒト3次元培養表皮

LabCyte EPI-MODEL

（ラボサイト エピ・モデル）



EPI-MODEL12



EPI-MODEL24

ご使用前に必ずお読みください。

J-TEC

目次

Ⅰ. LabCyte EPI-MODEL(ラボサイト　エピ・モデル)の特徴・・・・・2

Ⅱ. 梱包内容と各製品の名称・説明・・・・・・・・・・・・・・・・3

Ⅲ. 取り扱い・注意・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・4

Ⅳ. 使用方法

（1）基本的な試験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・5

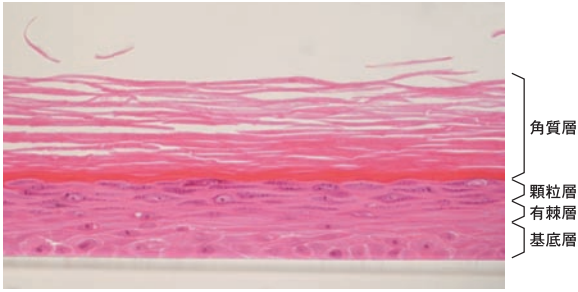
（2）エアーリフト培養・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 11

Ⅴ. ご注意・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 13

このたびは「LabCyte EPI-MODEL（ラボサイト エピ･モデル）」（ヒト３次元培養表皮）をお買い上げいただき、ありがとうございます。ご使用前に本取扱説明書をお読みになり、皮膚研究・化粧品原料などの評価にお役立てください。

Ⅰ. LabCyte EPI-MODEL（ラボサイト エピ・モデル）の特徴

「LabCyte EPI-MODEL（ラボサイト エピ･モデル）」は、ヒト正常皮膚細胞を用いて培養し重層化したヒト３次元培養表皮です。形態的にヒト皮膚に類似した構造をしており、基底層・有棘層・顆粒層・角質層を有しています。
本製品は、主として実験動物による皮膚刺激性試験の代替材料として用いることができます。その他、ヒト表皮に関する毒性・薬理研究・皮膚科学研究等にもご利用いただけます。
本製品は、弊社が開発している医療用培養表皮技術を応用した優れた技術により製造されています。このため、ウェル間・ロット間のバラツキが少なく、再現性の高い評価試験結果を得ることができます。

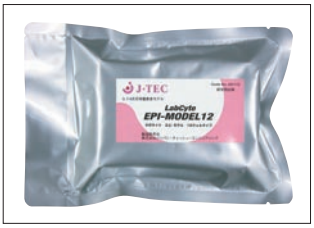


ヘマトキシリン・エオジン染色像

Ⅱ. 梱包内容と各製品の名称・説明

キットには下記の製品が入っていますので、ご確認ください。

①ヒト3次元培養表皮:1プレート



EPI-MODEL12

EPI-MODEL24

ヒト3次元培養表皮は1プレートごとにアルミ包装されています。
ヒト表皮組織は、寒天培地中に固定された培養カップ上に入っています。
培養カップは、1プレートに
- ●EPI-MODEL12の場合＝12個
- ●EPI-MODEL24の場合＝24個　入っています。

②アッセイ培地:30ml

ヒト 3 次元培養表皮専用の培地です。

③アッセイプレート:1プレート

12ウェル アッセイプレート

24ウェル アッセイプレート

寒天培地中に固定されたヒト表皮組織の入った培養カップを取り出し、このプレートに移して使用します。
- ●EPI-MODEL12の場合＝12ウェルアッセイプレート
- ●EPI-MODEL24の場合＝24ウェルアッセイプレート

Ⅲ. 取り扱い・注意（製品の受け入れ）

① 入荷後の確認

本製品をお受け取り後、直ちに開梱し、製品に破損や液漏れがないことを確認してください。
万一不備がございましたら、お手数ですが下記までご連絡ください。

株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング　営業部
TEL：0533-66-2129　　FAX：0533-66-2018

② 保存と使用期限

ヒト３次元培養表皮はアルミ包装状態のまま、常温で保存してください。使用期限は、アルミ包装のラベルに記載されています。再現性を良くするために、試験をおこなうまでの保存期間を一定にすることをお勧めします。

開封後は、できる限りすべての培養カップを使い切ってください。付属のアッセイ培地中での保存やCO_2インキュベーター（37℃、5～10%CO_2）内での保存は細胞の代謝を促進するため適していません。

なお、**アッセイ培地は、冷蔵（2～8℃）で保存**してください。使用期限はボトルのラベルに記載されています。

Ⅳ. 使用方法

ここでは、本製品を用いた試験・研究の一例をご説明いたします。本製品はヒト表皮組織に類似した構造をしております。お客様の目的に応じて、様々な試験・研究にご利用ください。

(1) 基本的な試験方法

＜試験の準備＞

① 機器
- ・クリーンベンチ(又は安全キャビネット)
- ・ウォーターバス
- ・CO_2インキュベーター(37℃、5～10%CO_2)
- ・96ウェルマルチプレートリーダー(540～590nm、650nm)

② 試薬・器具
- ・アッセイ培地【付属品・別売品】
- ・アッセイプレート【付属品・別売品】
- ・MTT試薬【別売品】
- ・96ウェルプレート【別売品】
- ・イソプロパノール
- ・リン酸緩衝液(PBS)
- ・ピンセット(滅菌済み)
- ・ピペット(滅菌済み)
- ・マイクロチューブ

＊MTT試薬、96ウェルプレートは別売でご用意しておりますので、当社までお問い合わせください。

＜試験方法＞

① 準備

操作はすべて、クリーンベンチ(又は安全キャビネット)内で、**無菌的**におこなうことをお勧めします。

(1)アッセイ培地を37℃のウォーターバスで温めます。

(2)アッセイプレートの各ウェルに、温めたアッセイ培地を下記のとおり分注します。

分注量:EPI-MODEL12の場合 = 1ml／ウェル
EPI-MODEL24の場合 = 0.5ml／ウェル

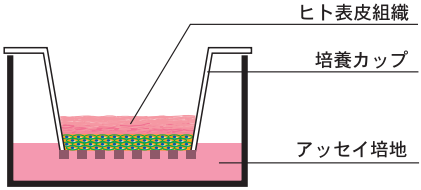
(3)ヒト表皮モデルをアルミ包装袋より取り出します。

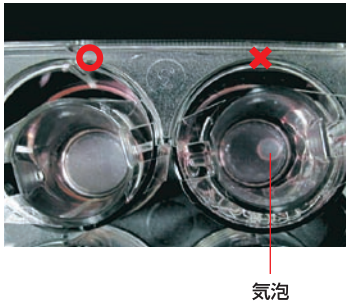
(4)プレートのフタを開け、ヒト表皮組織が入った培養カップを滅菌済みピンセットで取り出します。

Point
培養カップ底面と寒天培地の間に空気を入れるようにすると、容易に取り出すことができます。

⚠〔CAUTION〕
培養カップ内のヒト表皮組織表面には、触れないように注意してください。培養カップの外側に付着している寒天培地は、ピンセットなどで注意深く取り除いてください。

(5) 培養カップを、アッセイ培地の入ったアッセイプレートの各ウェルに移します。





⚠〔CAUTION〕
培養カップ底面に**気泡が入らないように**注意してください。気泡はピンセットで培養カップを揺すったりすると取り除くことができます。

(6) アッセイプレートにフタをして、CO_2インキュベーターに入れます。
(7) 評価物質の暴露までに、最低1時間静置します。

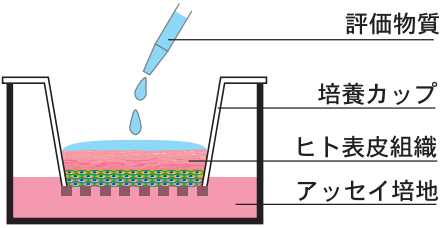
② 評価物質の暴露

操作はすべて、クリーンベンチ（又は安全キャビネット）内で、**無菌的**におこなうことをお勧めします。

(1)アッセイプレートをCO_2インキュベーターから取り出します。

(2)評価物質を培養カップの表皮組織表面に必要量添加します（全面に均一にゆきわたらせてください）。

陰性対照としては、何も暴露しないか、又は評価物質の溶媒などを用いて、目的に応じて同様の操作をおこなってください。



Point 評価物質の適用量は、液体の場合、EPI-MODEL12は通常100μl、EPI-MODEL24は通常50μlです。EPI-MODEL12の場合は最大1.5mlまで、EPI-MODEL24の場合は最大0.8mlまで適用することができます。粘性の高い物質や固形物質の場合は、天秤を用いて重量で適用してください。スパテルなどを用いて、表皮組織表面を傷つけないように塗布してください。

(3) アッセイプレートにフタをして、CO_2インキュベーターに入れます。

(4) 設定した時間暴露します。

③ MTT反応

操作はすべて、クリーンベンチ（又は安全キャビネット）内で、**無菌的**におこなうことをお勧めします。

(1) MTT3-(4,5-Dimethylthiazol-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide)を培地（DMEMなど）に溶解して、MTT培地を調製します（終濃度：0.5mg/ml）。必要に応じてMTT培地を、0.22μm、又は0.45μmフィルターでろ過滅菌します（24時間程度の短時間暴露の場合には、特に滅菌の必要はありません）。MTT培地は試験直前に用時調製します。**溶解後は冷暗所で保存**し、できるだけ早く使用してください（24時間以内）。ご使用の**1時間前には37℃のウォーターバスで温めます。**

(2) 抽出液としてイソプロパノールをご用意ください。

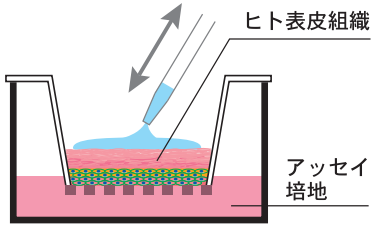
(3) 評価物質を設定した時間暴露した後、アッセイプレートをCO_2インキュベーターから取り出します。

(4) 培養カップ内の評価物質を吸引除去します。

Point EPI-MODEL24の場合は、培養カップの直径が小さいため、先端の細いパスツールピペット、又はアスピレーティングピペットの先端にイエローチップを取り付けたものを用いると容易に吸引することができます。

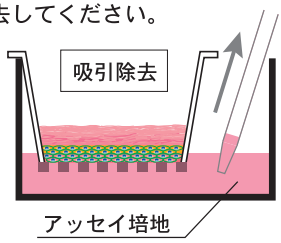
⚠(CAUTION)
ヒト表皮組織表面を傷つけないように注意しておこなってください。

(5) 残存している評価物質を取り除くための**洗浄作業**(培養カップ内部にリン酸緩衝液(PBS)を8分目程満たす・抜きとる作業)**を3回以上**おこないます。評価物質の性状によって洗浄方法が異なります。洗浄方法については、お問い合わせください。



⚠〔CAUTION〕 表皮組織表面に評価物質が残存する場合、キムワイプ・スパテルなどを用いて、表皮組織表面を傷つけないように取り除き、再度洗浄をおこなってください。万一、表皮組織が培養カップ底面から剥がれてしまった場合は、吸引しないように注意深く取り扱い、培養カップ底面に再度載せた状態で、次の処理をおこなってください。

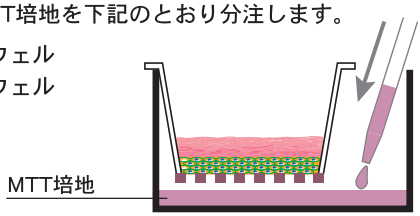
(6) 各ウェルの培養カップの外側の培地を吸引除去してください。



Point EPI-MODEL24の場合は、培養カップとプレートウェルの間が狭いため、先端の細いパスツールピペット、又はアスピレーティングピペットの先端にイエローチップを取り付けたものを用いると容易に吸引することができます。

(7) 各ウェルの培養カップの外側に温めたMTT培地を下記のとおり分注します。

分注量:EPI-MODEL12の場合 = 1ml／ウェル
EPI-MODEL24の場合 = 0.5ml／ウェル

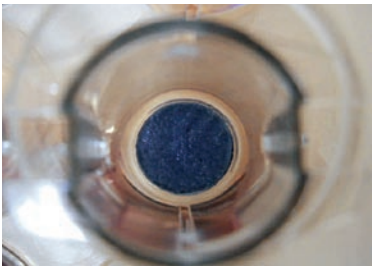


(8) アッセイプレートにフタをして、CO_2インキュベーターに入れます。
(9) 3時間静置します。

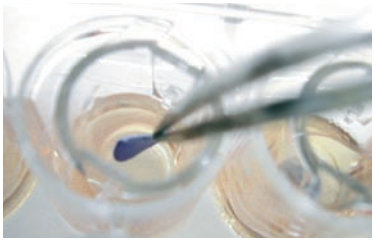
④ MTT抽出・吸光度測定

操作はすべて、通常の実験室内でおこなうことができます（無菌操作の必要はありません）。

(1) MTT反応終了後、アッセイプレートをCO_2インキュベーターから取り出します。
陰性対照のウェルが紫色に染まっていることを確認してください。



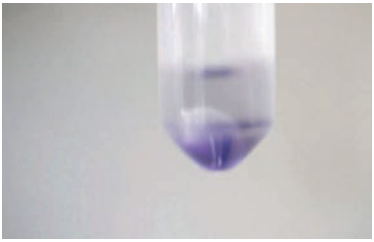
(2)培養カップ内のヒト表皮組織をピンセットでつまんで取り出します。

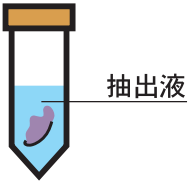


Point 評価物質によって皮膚組織構造が壊れてピンセットでつまめない場合、スパテルなどを用いて皮膚組織をかき集める、又は培養カップ底面のメンブランフィルターごとメスなどで切り取ってください。

(3) 取り出した各ヒト表皮組織片（メンブランフィルターがついたままでも可）をマイクロチューブに入れます。

(4) マイクロチューブに抽出液を入れ、ヒト表皮組織片を完全に浸漬します。





Point 抽出液量は、EPI-MODEL12の場合は通常300～500μl、EPI-MODEL24の場合は通常200～300μlが適当です。

(5) 室温・暗所で2時間以上(24時間以内)静置して色素を抽出します。
長時間抽出するときは、抽出液の蒸発を避けるため、チューブを完全に密栓してください。

(6) 抽出終了後、マイクロチューブ内の抽出液を96ウェルプレートの各ウェルに入れます。ブランクには抽出液を用いてください。

(7) 96ウェルマルチプレートリーダーを用いて、540～590nm(通常570nm)の吸光度を測定します。
650nmの吸光度を差し引くことにより、より正確なデータを得ることができます。

(8) 陰性対照の吸光度からブランクの吸光度を引いた値を100%として、評価物質の生細胞率を算出します。

$$\text{生細胞率}(\%) = \frac{\text{評価物質の吸光度}-\text{ブランクの吸光度}}{\text{陰性対照の吸光度}-\text{ブランクの吸光度}} \times 100$$

Point 通常1ウェルあたりEPI-MODEL12の場合は200μl、EPI-MODEL24の場合は150μlで測定します。

(2) エアーリフト培養

＜試験の準備＞

① 機器
- ・クリーンベンチ(又は安全キャビネット)
- ・ウォーターバス
- ・CO_2インキュベーター(37℃、5～10%CO_2)

② 試薬・器具
- ・アッセイ培地【付属品・別売品】
- ・アッセイプレート【付属品】
- ・ピンセット(滅菌済み)
- ・ピペット(滅菌済み)

＊アッセイ培地は別売でご用意しておりますので、当社までお問い合わせください。

＜試験方法＞

操作はすべて、クリーンベンチ(又は安全キャビネット)内で、**無菌的**におこなってください。

(1) アッセイ培地を37℃のウォーターバスで温めます。

(2) アッセイプレートの各ウェルに温めたアッセイ培地を下記のとおり分注します。
分注量:EPI-MODEL12の場合 = 1ml／ウェル
EPI-MODEL24の場合 = 0.5ml／ウェル

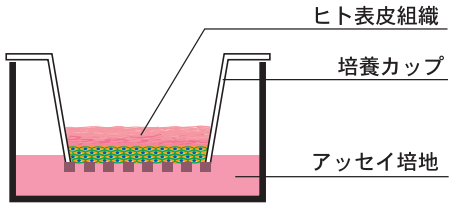
(3) 製品をアルミ包装袋より取り出します。

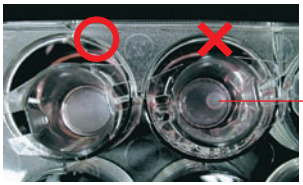
(4) プレートのフタを開け、ヒト表皮組織が入った培養カップを滅菌済みピンセットで取り出します。

Point
培養カップ底面と寒天培地の間に空気を入れるようにすると容易に取り出すことができます。

⚠(CAUTION)
培養カップ内のヒト表皮組織表面には触れないように注意してください。
培養カップの外側に付着している寒天培地は、ピンセットなどで注意深く取り除いてください。

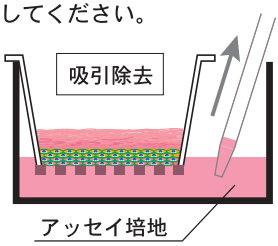
(5) 培養カップをアッセイ培地の入ったアッセイプレートの各ウェルに移します。





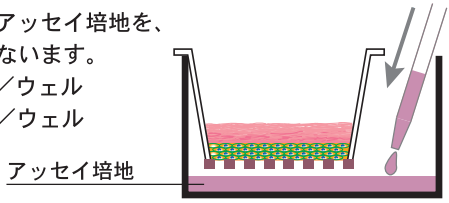
⚠(CAUTION)
培養カップ底面に気泡が入らないように注意してください。気泡はピンセットで培養カップを揺すったりすると取り除くことができます。

(6) アッセイプレートにフタをして、CO_2インキュベーターに入れます。
(7) 翌日、アッセイプレートをCO_2インキュベーターから取り出します。
(8) 各ウェルの培養カップ外側の培地を吸引除去してください。



Point EPI-MODEL24の場合は、培養カップとプレートウェルの間が狭いため、先端の細いパスツールピペット、又はアスピレーティングピペットの先端にイエローチップを取り付けたものを用いると、容易に吸引することができます。

(9)各ウェルの培養カップの外側に温めたアッセイ培地を、
下記のとおり分注して培地交換をおこないます。
分注量:EPI-MODEL12の場合 = 1ml／ウェル
EPI-MODEL24の場合 = 0.5ml／ウェル



(10)アッセイプレートにフタをして、CO_2インキュベーターに入れます。
(11) 以後、同様の培地交換操作を目的の**培養期間中は毎日**おこなってください。

V. ご注意

・本製品は研究用以外の目的で使用しないでください。

・いかなる場合においても、**ヒト・動物への適用やin vitro診断に用いることは認められていません**。

・ウィルス（HIV, HBV, HCV, HPV）感染に関する検査は実施しておりますが、ご使用に際しては十分にご注意ください。

・ご使用に際しては、目的の評価物質での予備試験をおこなうことをお勧めいたします。

・本製品の本来の使い方以外で生じたいかなる事故や損害についても、当社は一切の責任を負いかねますので、ご了承ください。

・本製品のご入荷後において、以下のような場合には、本製品の返品・交換はいたしかねますので、ご了承ください。
（1）不当な取り扱いによる損傷
（2）落下等の不注意による損傷
（3）火災、地震、水害、落雷、その他の天変地変等の不可抗力による損傷

・本製品をご使用後は、適切な処理をおこなった上で廃棄してください。

【製造・販売元】

株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング

〒443-0022　愛知県蒲郡市三谷北通6-209-1

TEL：0533-66-2129（営業部代表）　FAX：0533-66-2018

E-Mail：info@jpte.co.jp　URL：http://www.jpte.co.jp

2010年10月作成